CORSO INTEGRATO DI GENETICA

a.a.2011-2012

Prof. Pier Franco Pignatti

13.12.2011

Lezioni N. 53-54

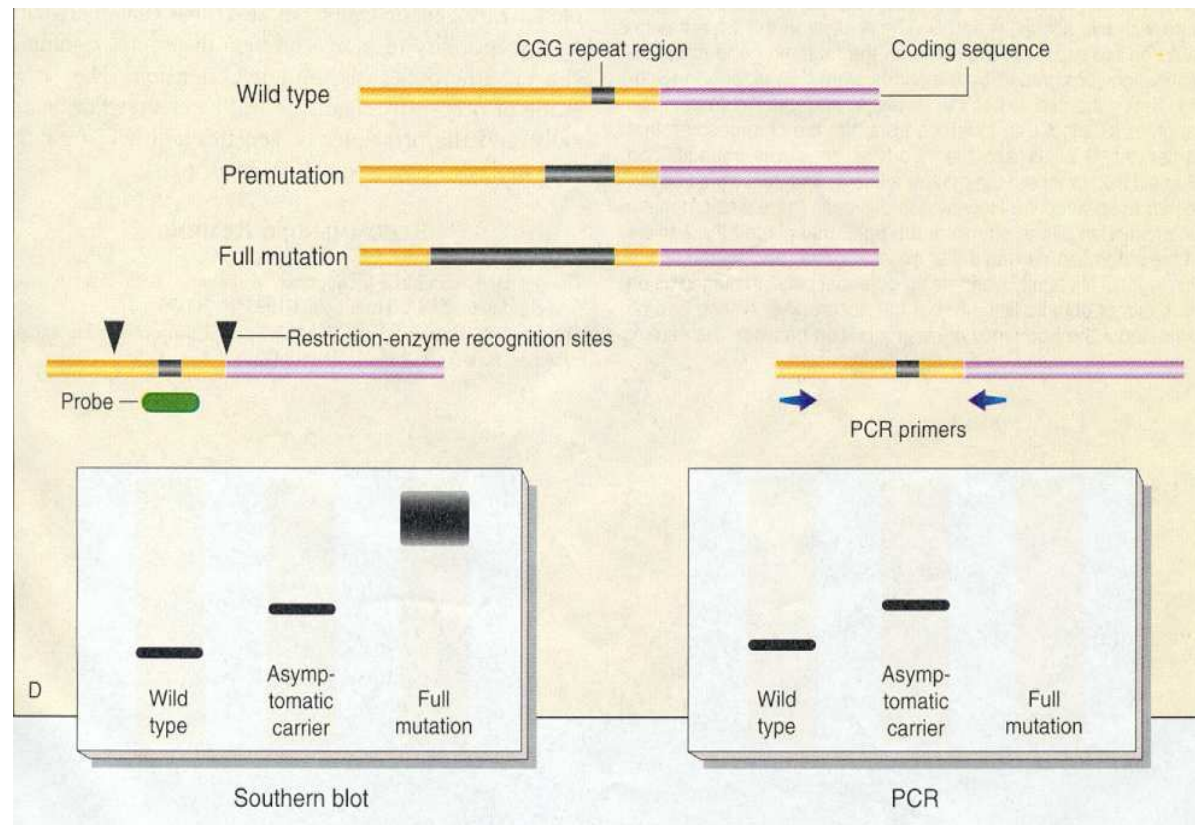
Malattie da mutazioni dinamiche

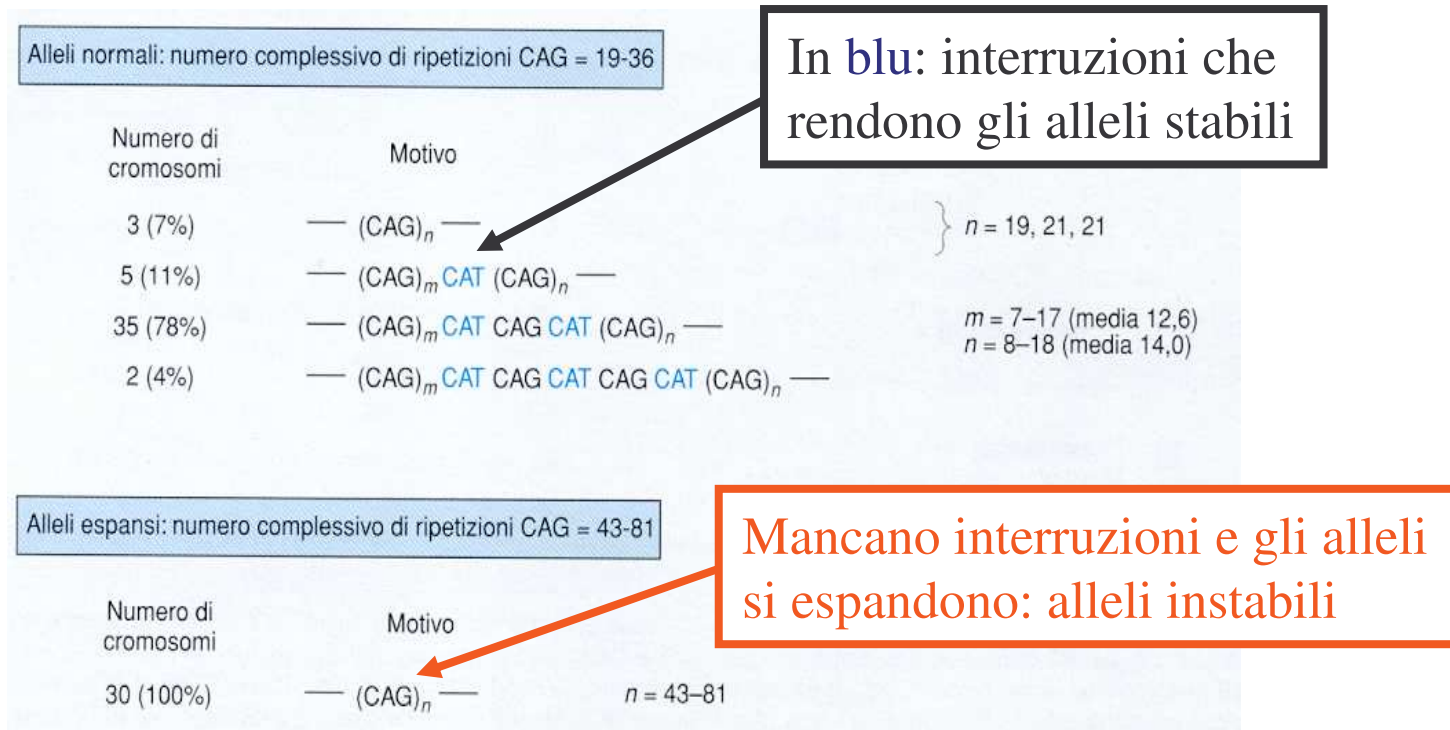
(Neri-Genuardi cap. 15)

Espansione di triplette, premutazioni, anticipazione

Le sequenze di DNA ripetuto sono spesso coinvolte in malattie

- ✓ Crossing-over diseguale
- ✓ Scambio diseguale fra cromatidi fratelli
- ✓ Conversione genica
- ✓ Duplicazione
- ✓ Delezione
- ✓ Inserzione
- ✓ Inversione
- ➢ Espansione di ripetizioni instabili ⟶

Espansione di ripetizioni instabili

NEJM 332:1499, 1995

Instabilità delle ripetizioni

SCA1: Ataxina 1 espansa entra nel nucleo cellulare dove può determinare una alterazione della espressione genica

Strachan e Read, Genetica Molecolare Umana UTET 2000

Meccanismo di espansione

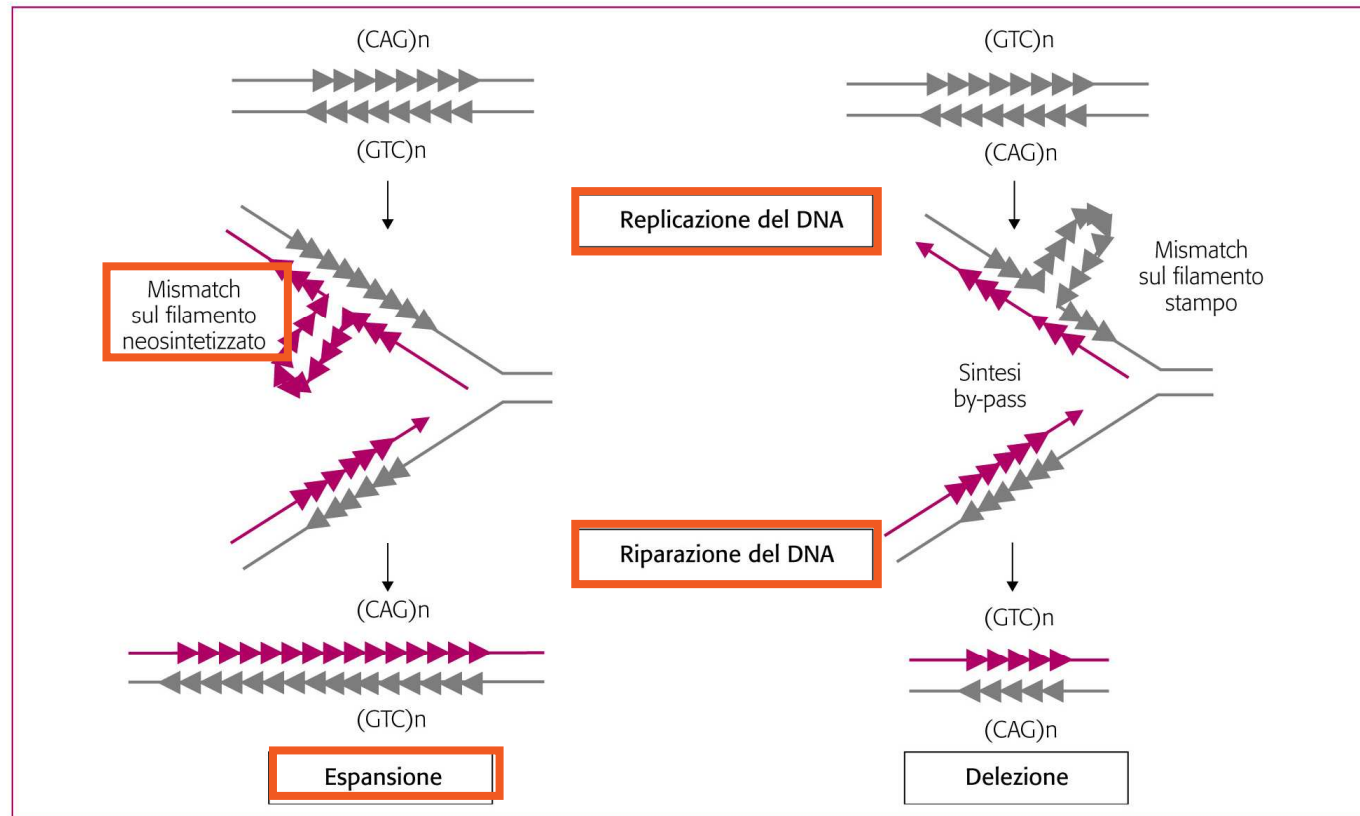



Figura 14.1 Replication slippage e piccole espansioni o contrazioni di sequenze microsatelliti. A seconda che si formi una struttura a forcina non appaiata (mismatched hairpin) sul filamento neosintetizzato o sul filamento stampo, dopo erronea riparazione del DNA, si otterrà rispettivamente un allungamento (espansione) o una contrazione della sequenza ripetuta instabile.

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano, 2007

Espansione massiva

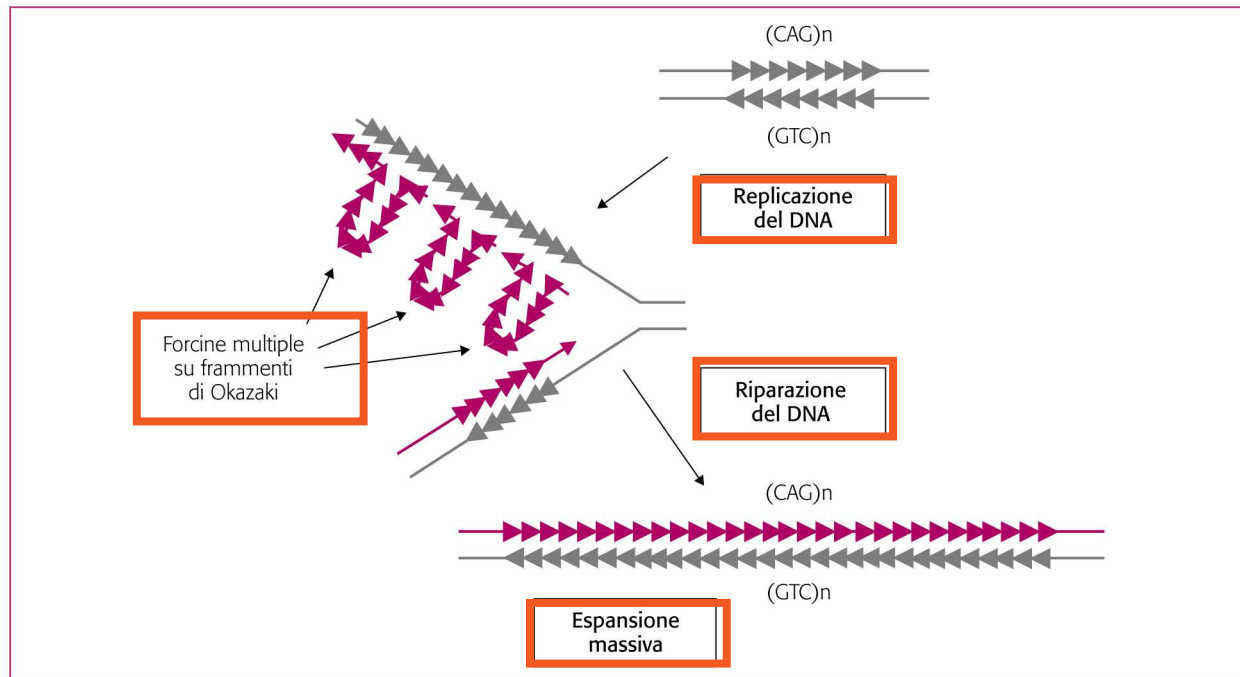



Figura 14.2 Formazione di strutture a forcina multiple su frammenti di Okazaki ed espansioni massive di una sequenza microsatellite. L'espansione massiva di una sequenza ripetuta (ovvero superiore alla lunghezza iniziale del tratto ripetuto stesso) potrebbe comportare la formazione di molteplici forcine a carico dei frammenti di Okazaki interamente compresi nella sequenza ripetuta.

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano, 2007

Espansioni non codificanti

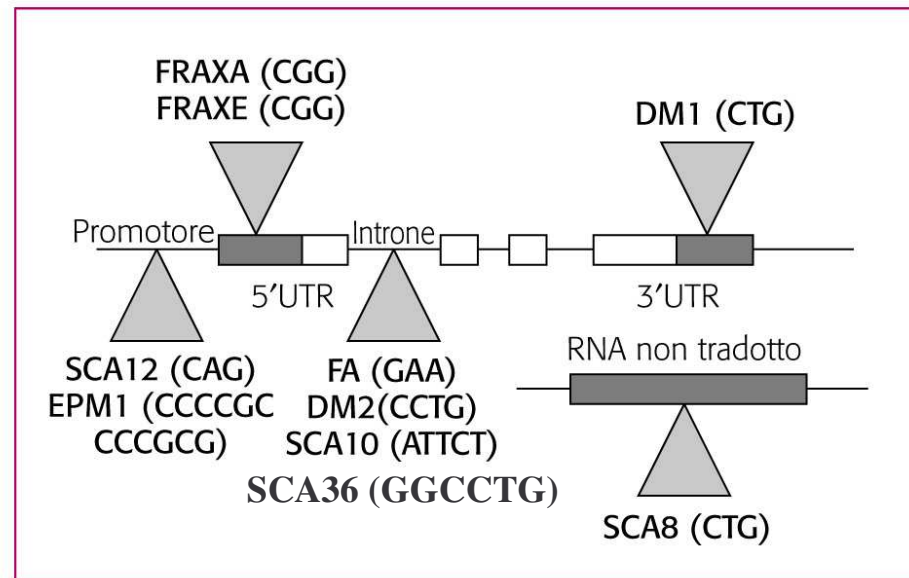



Figura 14.3 Patologie genetiche dovute a mutazioni dinamiche di sequenze non comprese in regioni codificanti dei rispettivi geni. SCA12 = atassia spino-cerebellare di tipo 12; EPM1 = epilessia mioclonica di tipo 1; FRAXA = sindrome X fragile; FRAXE = ritardo mentale associato a sito fragile FRAXE; FA = atassia di Friedreich; DM2 = distrofia miotonica di tipo 2; SCA10 = atassia spino-cerebellare di tipo 10; DM1 = distrofia miotonica di tipo 1; SCA8 = atassia spino-cerebellare di tipo 8.

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano, 2007

Espansioni codificanti glutamina

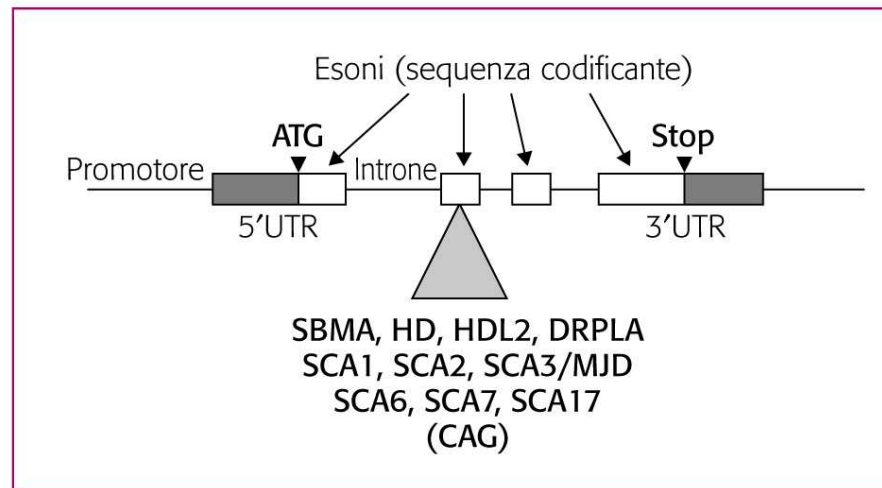
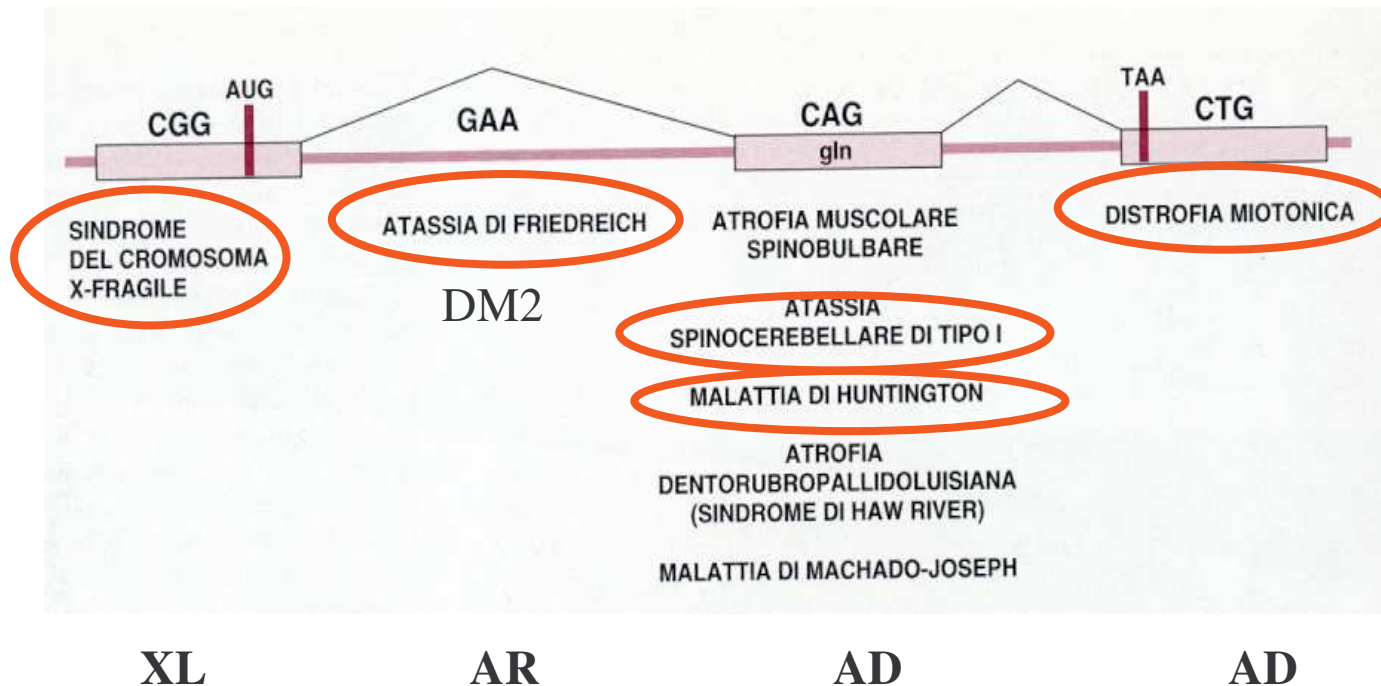



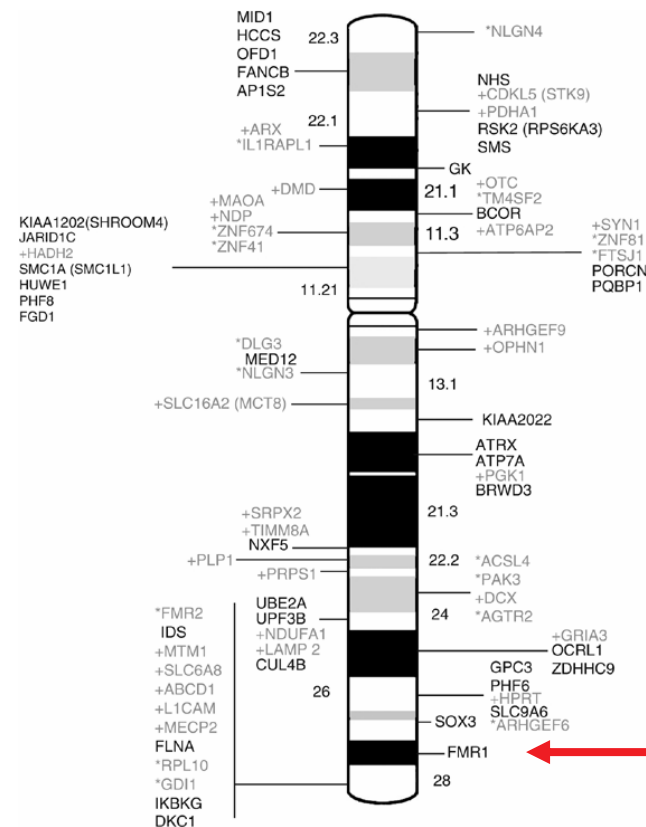
Figura 14.4 Patologie genetiche dovute a mutazioni dinamiche di sequenze comprese all'interno di esoni e codificanti per tratti di poliglutamina (poliQ).
SBMA = atrofia muscolare spino-bulbare o malattia di Kennedy; HD = malattia di Huntington; HDL2 = malattia Huntington-like di tipo 2; DRPLA = atrofia dentato-rubro-pallidoluysiana; SCA1 = atassia spino-cerebellare di tipo 1; SCA2 = atassia spino-cerebellare di tipo 2; SCA3/MJD = atassia spino-cerebellare di tipo 3/malattia di Machado-Joseph; SCA6 = atassia spino-cerebellare di tipo 6; SCA7 = atassia spino-cerebellare di tipo 7; SCA17 = atassia spino-cerebellare di tipo 17.

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano, 2007

Malattie di mutazioni dinamiche

>40 m. neurologiche, neurodegenerative, neuromuscolari

Gelehrter Collins Ginsburg Genetica Medica Masson 1999; JRGatchel & H Zoghbi 2005

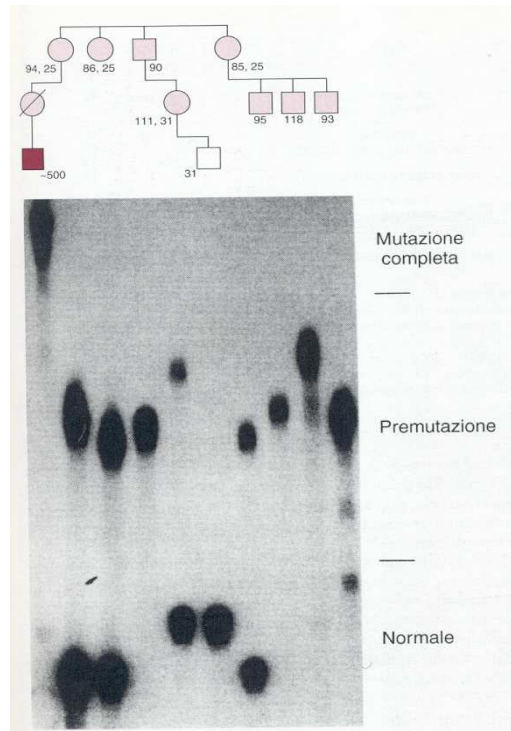
SINDROME DEL CROMOSOMA X FRAGILE FXS

XLMR

Più di 200 forme e c. 90 geni per ritardo mentale XL.
Nero: geni responsabili di sindrome; Grigio: geni per patologia neuromuscolare o ritardo mentale isolato

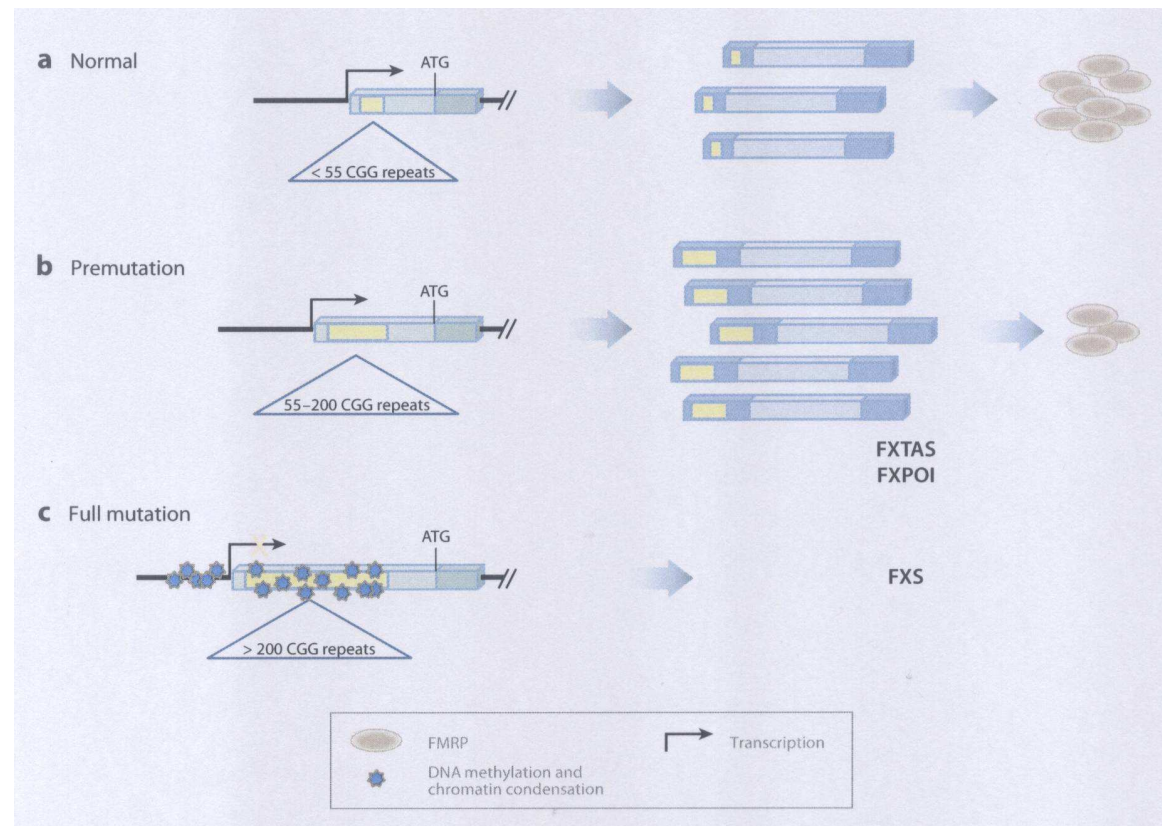
SINDROME DELL'X FRAGILE

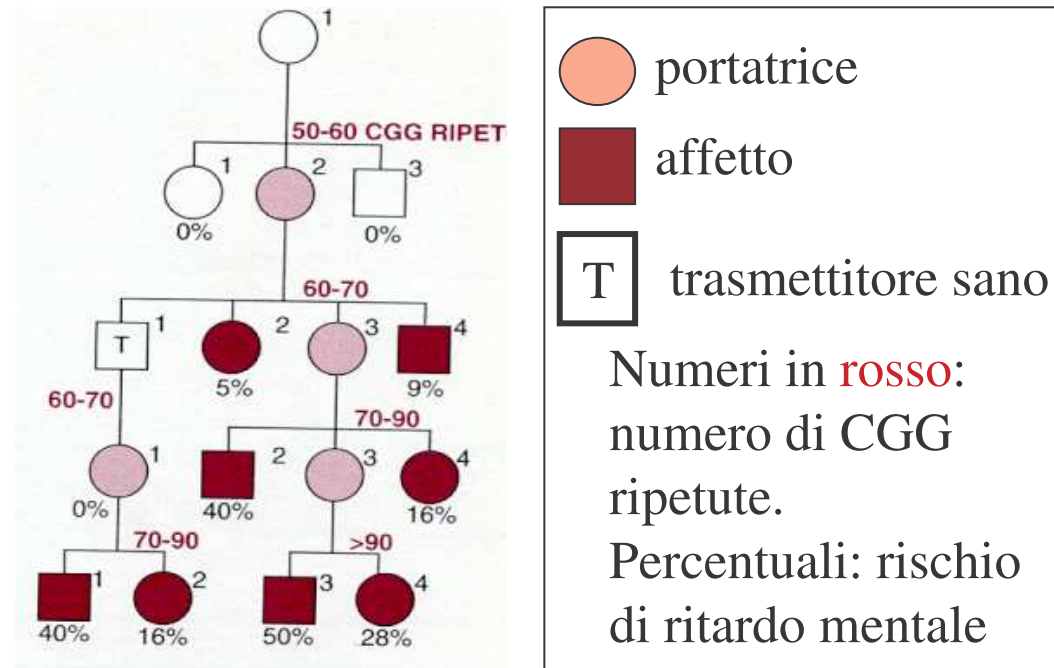
La forma più comune di ritardo mentale ereditario.
1:4.000 maschi, 1:6.000 femmine
S. di Martin-Bell (1943)

Sito fragile Xq27.3 (FRAXA) in terreno privo di folato (Lubs 1969)

ESPANSIONE di FMR1

1991: identificazione del gene FMR1 e della prima mutazione dinamica, che si modifica nel passaggio da una generazione all’altra

Gelehrter Collins Ginsburg Genetica Medica Masson 1999

Espansione di triplette gene FMR1

Santoro MR et al, Ann Rev Pathol Mech Dis 2012

Ereditarietà FXS

Paradosso di Sherman: aumento del numero di casi (penetranza) col passare delle generazioni. Espansione preferenziale nella linea femminile

Gelehrter Collins Ginsburg Genetica Medica Masson 1999

Funzione del gene FMR1

FMRP è una proteina che lega l'RNA e regola la traduzione di un gruppo di mRNA dei dendriti inibendo l'attività di altri geni

Topi con gene Fmr1 inattivato hanno perdita della proteina FMRP e alterata maturazione della trasmissione glutamatergica durante il periodo critico perinatale

FMRP è necessaria per il normale procedere della maturazione sinaptica durante lo sviluppo. La sua assenza causa una alterazione della funzionalità sinaptica

PREMUTAZIONE FMR1

La premutazione (55-200 CGG) può dare :

- **Sindrome con Tremore e Atassia associata a X fragile (FXTAS).** Malattia neurodegenerativa a inizio tardivo. La penetranza nei maschi di più di 70 anni è >50%, mentre nelle donne è minore
- **Insufficenza ovarica primaria associata a X fragile (FXPOI)** in c.20% delle donne portatrici della premutazione. Menopausa precoce

ATASSIA DI FRIEDREICH
FRDA

ATASSIA DI FRIEDREICH

La sindrome atassica ereditaria più frequente nelle popolazioni caucasoidi (3-4:100.000, AR)

Insorgenza pubertà, perdita progressiva coordinazione muovimenti ed equilibrio

Deficit di energia: anche cardiomiopatia ipertrofica che può condurre a morte precoce

Gene FXN (frataxina) mappato cr. 9q13

Triplette GAA nel primo introne: da 35-40 normale a 70-1000 espansioni causano silenziamento genico

Frataxina

Proteina mitocondriale che mantiene omeostasi Fe mitocondriale ed ha ruolo protettivo del danno nucleare

FRDA: la funzione mitocondriale è alterata con sovraccarico di Fe, difetto produzione ATP, difetto funzionamento neuroni e cardiomiociti; instabilità cromosomica, aumento sensibilità mutageni chimici e specie reattive dell’ossigeno (ROS)

Tentativi terapeutici di rimozione Fe mitocondri mediante sostanze chelanti, di contrasto allo stress ossidativo con antiossidanti, di aumento dell’espressione genica con eritropoietina e inibitori della deacetilasi istonica

POLIGLUTAMINOPATIE
PoliQ

POLIGLUTAMINOPATIE

Una famiglia comprendente 9 malattie neurodegenerative da espansione

Il tratto poliglutaminico conferisce un guadagno di funzione tossico alle proteine che porta a inizio tardivo della malattia e perdita progressiva di neuroni in regioni specifiche del SNC

Possibile contributo di modificazioni post-traduzionali della proteina

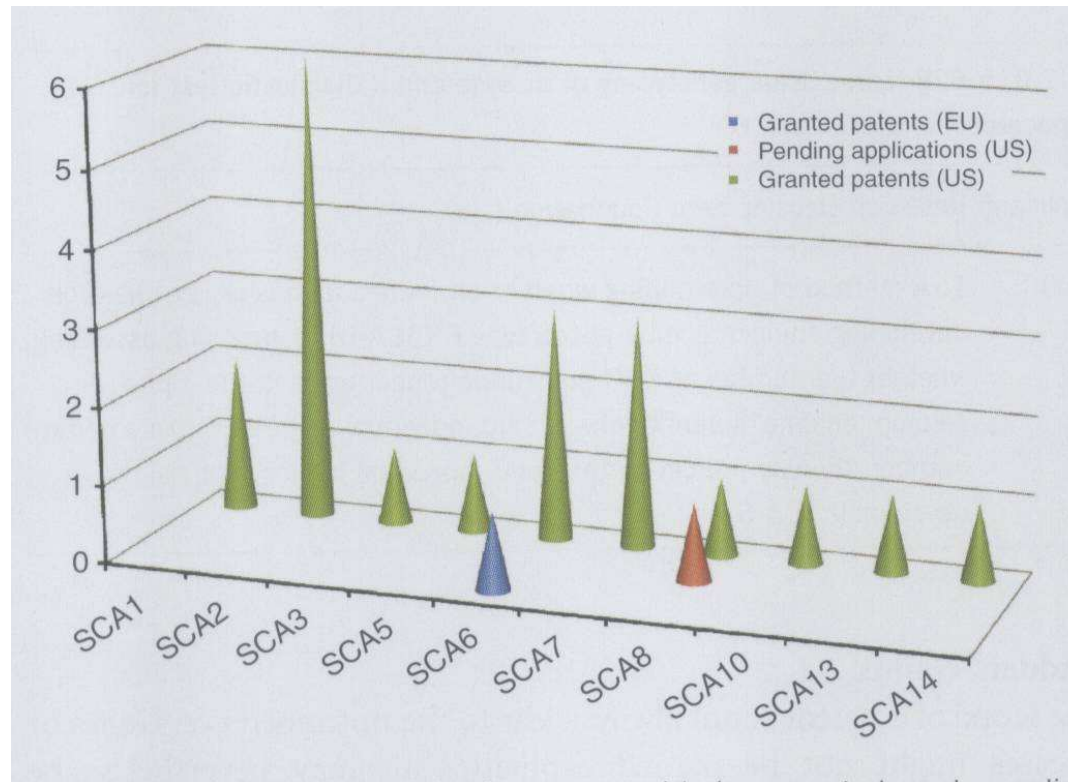
POLIGLUTAMINOPATIE

TABLE 3. NEUROLOGIC DISEASES CAUSED BY AN INCREASED NUMBER OF UNSTABLE CAG REPEATS.

	DISORDER	PROTEIN	NORMAL NO. OF REPEATS	NO. OF REPEATS IN MUTANT PROTEIN	CHROMOSOME INVOLVED/ MODE OF TRANSMISSION
SBMA	Spinal and bulbar muscular atrophy	Androgen receptor	11–33	40–62	X/X-linked
HD	Huntington's disease	Huntingtin*	11–34	40–120	4p/autosomal dominant
SCA	Spinocerebellar ataxia				
	Type 1	Ataxin 1*	25–36	41–81	6p/autosomal dominant
	Type 2	Ataxin 2*	15–24	35–59	12q/autosomal dominant
	Type 3 (Machado–Joseph disease)	Ataxin 3*	13–36	62–82	14q/autosomal dominant
	Type 6	Ataxin 6	4–16	21–27	19p/autosomal dominant
	Type 7	Ataxin 7*	7–35	37–130	3p/autosomal dominant
DRPLA	Dentatorubropallido-luysian atrophy	Atrophin 1*	7–25	49–85	12p/autosomal dominant

*The function of this protein is unknown.

NEJM 340:1974, 1999

Test genetici brevettati per SCA

Berthels N et al, EJHG Nov 2011

MALATTIA DI HUNTINGTON (HD)

George Huntington (1872) descrive la malattia AD caratterizzata da disabilità motoria progressiva e deterioramento mentale, prevalenza 3-7:10.000

Figura 1.1 Malattia di Huntington.
(a) Una paziente in uno stadio avanzato della malattia che presenta movimenti involontari della testa e del viso. (Fotografie gentilmente fornite dal professor Peter Harper, Cardiff).
(b) Sezioni autoptiche che confrontano un cervello normale (a sinistra) con un cervello di un paziente con malattia di Huntington (a destra); si può notare la perdita di tessuto nel cervello della malattia di Huntington. (Fotografie gentilmente fornite dal Dottor David Crauford, St Mary's Hospital, Manchester.)

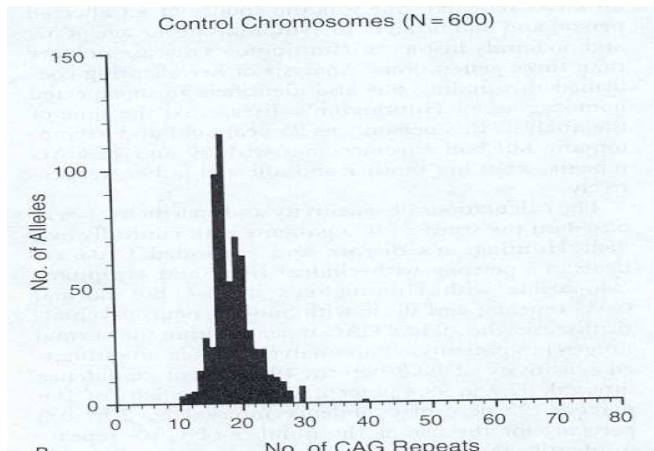
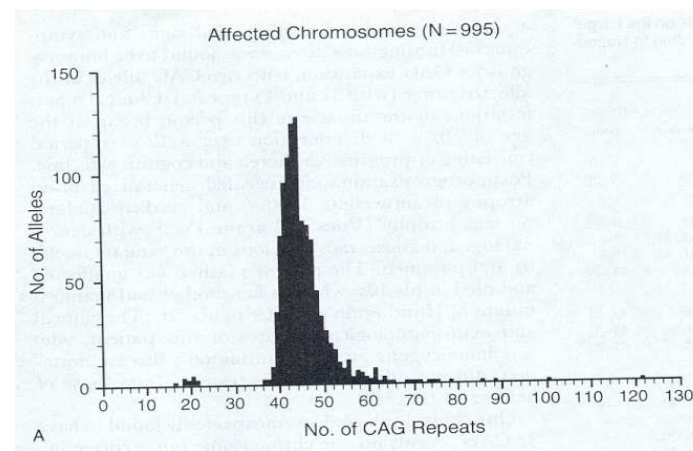
Read e Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007

Famiglia con HD

Famiglia venezuelana che ha permesso di
localizzare il gene sul cromosoma 4 nel 1983
(Gusella et al Science 225:1320,1984)

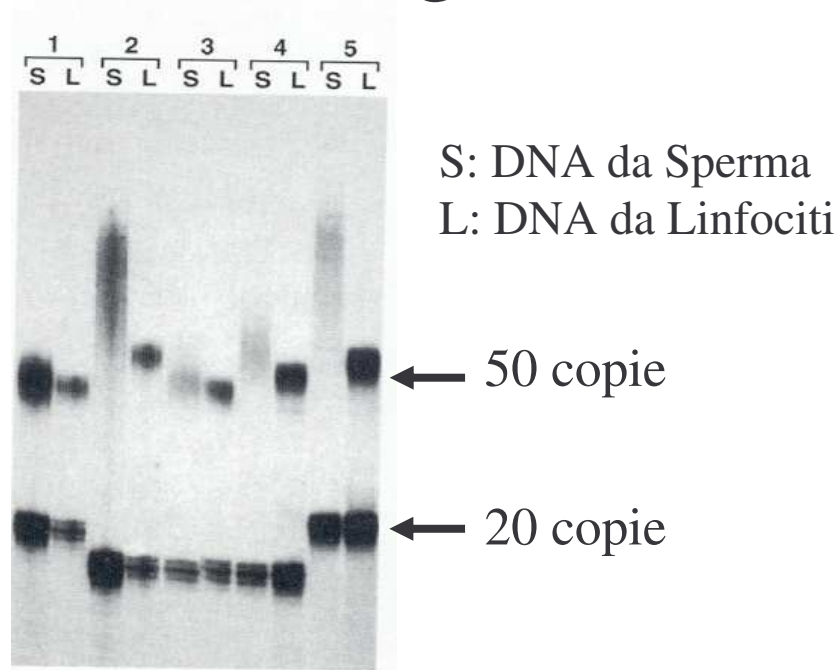
Gelehrter Collins Ginsburg Genetica Medica Masson 1999

Le ripetizioni CAG (Gln, Q) in HD

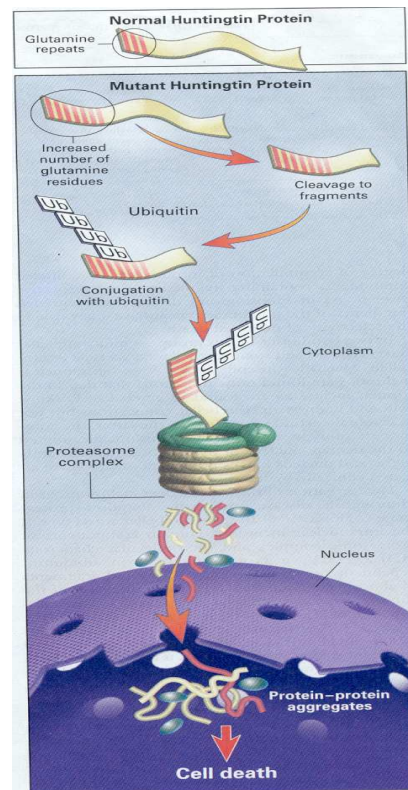
1993: identificazione del gene IT15

11-36 triplette: N

40-121triplette: HD

"Uno studio mondiale della mutazione HD"
Conclusioni: la lunghezza delle ripetizioni è un marcatore sensibile e specifico della ereditarietà della mutazione

NEJM 330,1994

Amplificazione del gene IT15

Si nota particolare instabilità delle triplette ripetute nella meiosi maschile. Infatti si può avere insorgenza precoce della malattia trasmessa dal padre. L’età di esordio è inversamente correlata alla lunghezza della espansione, anche nel tessuto cerebrale

Nature Genet 387,1993

Possibile meccanismo patogenetico poliQ

Formazione di inclusioni nucleari neuronali di aggregati proteici non specifici. Una proteina striato specifica lega poliQ-Htt. Fattori trascrizionali Purkinje specifici in SCA.

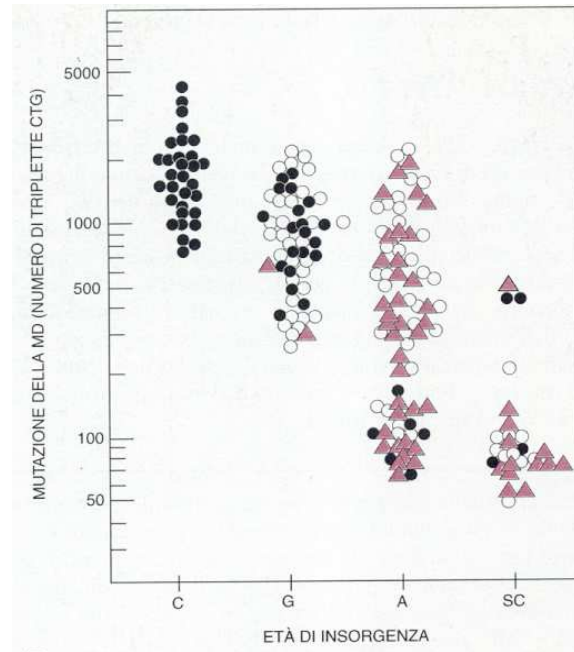
DISTROFIA MIOTONICA
DM

DISTROFIA MIOTONICA

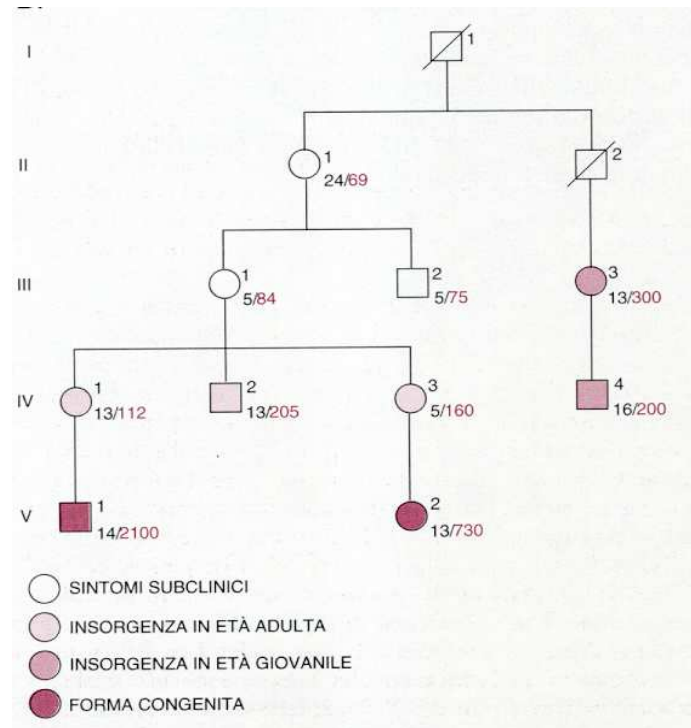
Amimia e aspetto scavato del volto, ptosi, iposviluppo muscolo mandibola e sternomastoideo.

Malattia di Steinert (1909) : ipotonia muscolare con miotonia (debolezza della contrazione muscolare e difficoltà rilassamento), deperimento, anomalie della conduzione cardiaca, …

La più frequente fra le distrofie muscolari a ereditarietà autosomica (1:8.000)

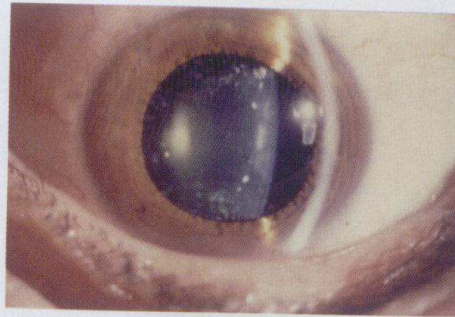
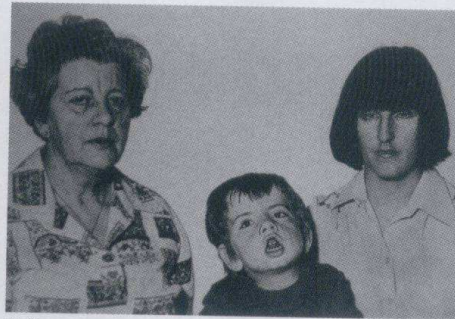
Numero di triplette DMPK ed età esordio

Triplette nella porzione 3'non tradotta del gene. Forme cliniche: **C**:congenita; **G**:giovanile; **A**:adulta; **SC**:subclinica (nessun segno clinico tranne elettromiogramma anomalo o altro). Genitore che trasmette: ● madre; ○ padre; △ ignoto.

Gelehrter Collins Ginsburg Genetica Medica Masson 1999

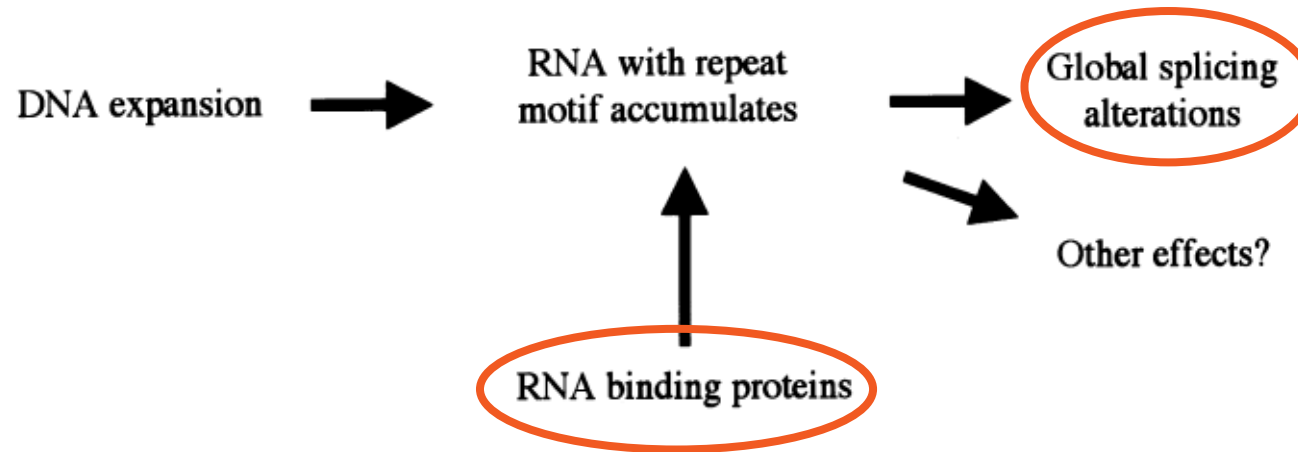
Famiglia con DM

Numero di triplette:
- in nero allele N (5-37 triplette)
- in rosso allele espanso (50-1.000 triplette)

L'età di esordio diminuisce con il passare delle generazioni mentre aumenta la gravità delle manifestazioni cliniche: il fenomeno della **anticipazione**

Gelehrter Collins Ginsburg Genetica Medica Masson 1999

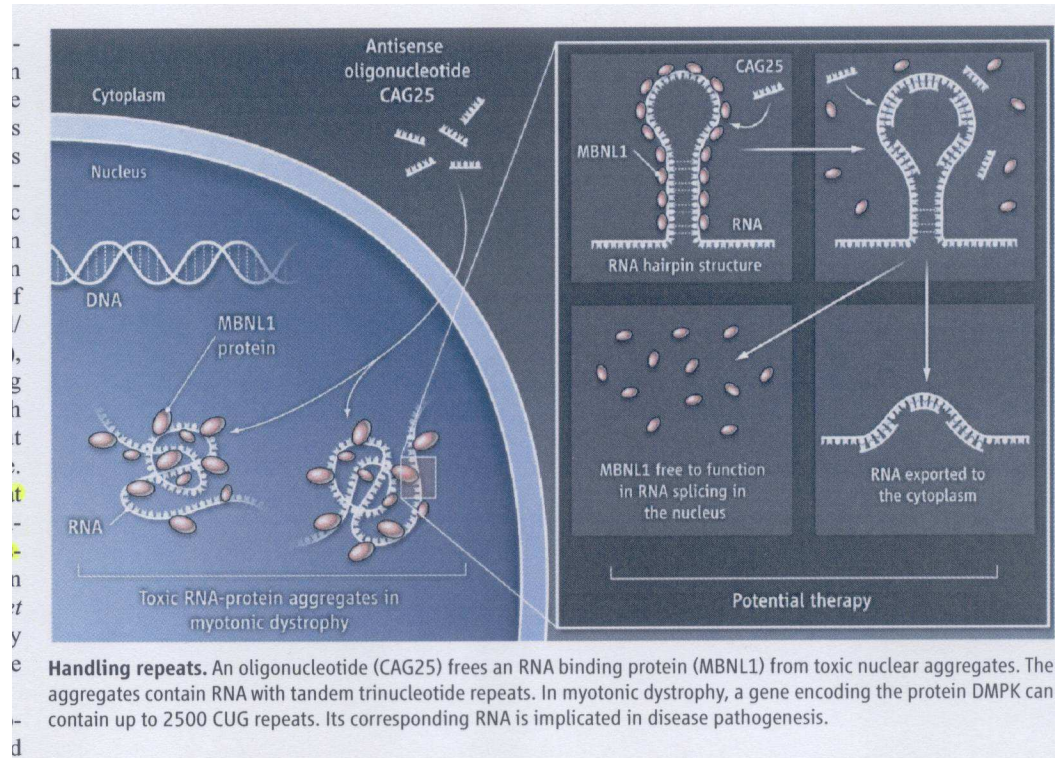
Anticipazione in DM

Box figure 4.4 – **Anticipation in myotonic dystrophy.**
(a) A 'blue-dot' cataract may be the only sign of the disease in the first affected generation. (b) A three generation family showing the grandmother who has bilateral cataracts but no muscle symptoms or facial weakness; her daughter has moderate facial weakness with ptosis and cataracts; the child has the congenital form. Reproduced from *Myotonic Dystrophy* by Peter Harper (Saunders, 3rd edition, 2001) with permission. (c) A baby with the congenital form showing hypotonia. The congenital form is seen only when the child inherits the disease from its mother. It is caused by very large expansions of the CTG repeat, which are never found in sperm.

Read A e D Donnai, New Clinical Genetics 2° ed., Scion 2011

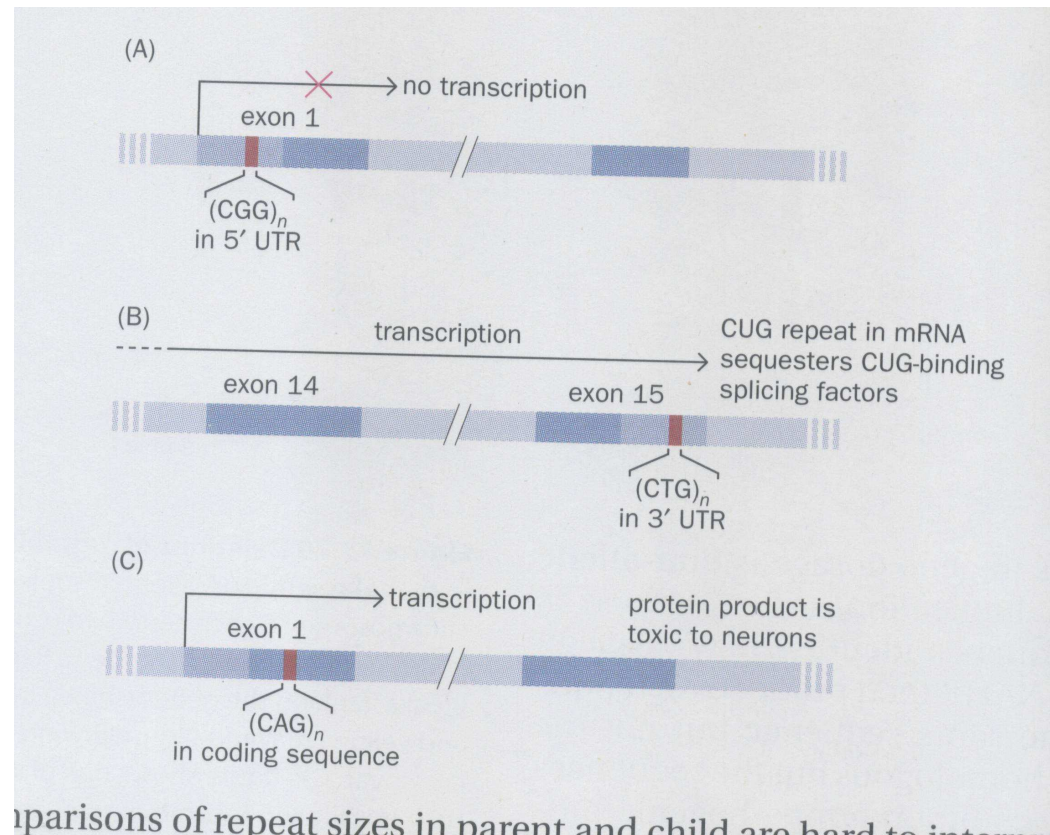
MODELLO di GUADAGNO DI FUNZIONE dell'RNA per DM

Espansione di sequenze non tradotte: CTG (DM1) o CCTG (DM2)

AJHG 74:793, 2004

Possibile neutralizzazione dell’RNA in DM1

Handling repeats. An oligonucleotide (CAG25) frees an RNA binding protein (MBNL1) from toxic nuclear aggregates. The aggregates contain RNA with tandem trinucleotide repeats. In myotonic dystrophy, a gene encoding the protein DMPK can contain up to 2500 CUG repeats. Its corresponding RNA is implicated in disease pathogenesis.

Un oligonucleotide libera una proteina che lega l’RNA espanso da aggregati nucleari tossici

Cooper TA 2009

Patogenesi malattie da espansione

A) Inibizione trascrizionale; B) RNA tossico; C) Proteina tossica

Effetti della espansione

Perdita funzione

Guadagno funz

Guadagno funzione RNA